253—257 28425(5)

动 物 学 研 究 1997，18（3）：253—257 CN 53-1040 Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

皱纹盘鲍受精过程的电镜观察*

孙振兴[1] 王如才 姜 明 刘晓云
（青岛海洋大学 266003）
谢嘉琳
（中国科学院海洋研究所 青岛 266071）

Q959.212

A 摘要 本文用透射电镜观察了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)的受精过程。鲍卵子的胶膜使精子活化，并诱发了顶体反应，卵黄膜使顶体反应达到高潮。精子入卵后，卵发生皮层反应并形成受精膜开始减数分裂。此外，还观察到鲍的多精入卵现象

关键词 皱纹盘鲍，受精，顶体反应，透射电镜 腹足纲

用电子显微镜观察水生动物的受精形态，在鱼类已有丰富的资料(Brummett 等，1979；Iwamatsu 等，1981；王瑞霞等，1982，1984；许雁等，1988；黄永松，1990)，但在无脊椎动物仅限于海胆(Lopo 等，1980，1981)和蟹类(堵南山等，1992)。皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)属原始腹足类、鲍科，主要分布于我国黄海和渤海以及日本北部、朝鲜半岛沿海，是我国北方重要的经济贝类之一。有关皱纹盘鲍的繁殖习性、胚胎及胚后发育、人工培育苗种等方面，已有较详尽的研究报道(猪野峻，1952；陈木等，1977；王如才等，1980；聂宗庆，1989)，但有关受精过程的亚显微观察，迄今尚未见报道。本文用透射电镜对皱纹盘鲍的受精过程进行了观察，现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

将性腺成熟的皱纹盘鲍的雌、雄亲鲍分别排放的卵子、精子混合受精。受精时立即取材一次，受精后从 1 s—60 min 每隔一定时间，分批取材固定。

1.2 样品制备、观察

供透射电镜观察的样品，用 2.5%戊二醛和 1%锇酸双固定，乙醇系列脱水，Epon812 包埋，LKB 型超薄切片机切片，醋酸氧铀-柠檬酸铅染色，日立 H-7000 型透射电镜观察。

2 结果和讨论

2.1 精子顶体反应时的形态变化

顶体反应前鲍的精子头部形态如图所示（图版 I:1a），精子前端有一帽状顶体，即顶

---

* 国家"攀登 B"计划资助项目 1) 现在烟台大学水产学院工作
本文 1996 年 3 月 28 日收到，同年 7 月 10 日修回

体帽(acrosome cap)，后面为精核(sperm nucleus)。核的前端有一杯状的凹陷，即为顶体下窝(acrosome fossa)。此时整个精子头部长约1.5 μm，最大处直径约0.9—1.0 μm。精子中段由数个线粒体构成（图版Ⅰ:2）。精子尾部鞭毛的横切面呈圆形，直径约0.22—0.25 μm，外周有质膜包围，其微管的横切面是典型的"9+2"结构(图版Ⅰ:1b)。鲍的成熟未受精卵表面是一层极薄的质膜(plasma membrane)，围绕其外的是卵黄膜(vitelline membrane)，卵黄膜的外围是很厚的胶膜(jelly coat)。胶膜是由一些不定形物质和分布稀疏的纤维状细丝所组成(图版Ⅰ:2)。

在光镜下观察，鲍排放到海水中的成熟精子，在与卵子相遇前只是无目标的漫游；一旦精子与卵子的胶膜相接触，便被胶膜所吸附。在透射电镜下观察到，当精子进入卵的胶膜时，顶体逐步向前突出(图版Ⅰ:2)，随着精子接近卵黄膜，顶体明显伸长(图版Ⅰ:3)，形成顶体突起(acrosoma process)。当顶体突起的顶端接触到卵黄膜时，精子头部伸至最长，其中顶体突起的长度约占整个精子头部长度的1/3(图版Ⅰ:4)。此时顶体反应达到高潮，精子穿过卵黄膜到达卵的质膜(图版Ⅰ:5)进入卵内。

由此可见，在鲍的顶体反应过程中，卵子的胶膜激活了精子，并诱发了顶体反应；卵黄膜使顶体反应达到高潮。这是由于胶膜中含有与卵黄膜的受体蛋白相类似的物质（也可能是卵黄膜上的物质扩散到了胶膜），这种物质有种的专一性，能够激活鲍的精子使其与卵子在海水中相互识别，并使精子改变漫游而迅速游近卵黄膜。这与海胆受精时的顶体反应(Lopo 等，1980)是非常相似的。

另外，在本研究中还发现，鲍排出体外无胶膜的卵，是不能受精的，这也说明鲍卵的胶膜对其受精是必不可少的。这与两栖类蛙卵一定要包有胶膜才能受精(丁汉波等，1987)是一致的。

2.2 受精膜的形成

鲍的精子穿入卵子之后，卵子发生皮层反应。位于鲍卵子皮层中的皮质小泡（cortical alveoli，亦称皮层颗粒）破裂，其内含的微小颗粒物逸出到质膜与卵黄膜之间，引起卵黄膜膨胀，并与卵黄膜共同形成受精膜(fertilization membrane)。受精膜与质膜之间的间隙为卵周隙(perivitelline space)。除了皮质小泡参与受精膜的形成外，本文还观察到在精子入卵后，卵子质膜上的许多微绒毛与质膜呈垂直方向拉长，其表面分泌出许多粘胶状微细颗粒，而且一些微绒毛基部的微吞饮泡(microphage)膨大破裂，其中的颗粒物质逸出到卵周隙中(图版Ⅰ:6)。据此我们推测，这些微绒毛的分泌物可能也参与了受精膜的形成。

关于鲍受精膜的形成，Lewis 等(1982)认为 *Haliotis rufescens* 的卵黄膜在受精前已经举起，且质膜与卵黄膜之间的间隙达数十微米，因此受精后不存在受精膜举起的现象。但根据本文在透射电镜下观察，皱纹盘鲍排出体外的成熟未受精卵，质膜与卵黄膜之间的间隙仅有0.6—1.2 μm(图版Ⅰ:2)，如此小的间隙，加之质膜极薄，在光镜下往往难以分辨，易给人们造成错觉。在两栖类中，蛙卵有3层或多层胶膜，当卵排到水中，胶膜就吸水膨胀(于豪建，1984)。本研究认为，鲍卵的胶膜并非1层，而类似于蛙卵的胶膜，所以在光镜下所见到的鲍成熟未受精卵膨胀举起的是胶膜，而并非卵黄膜。如前所述，鲍受精后的皮层反应使卵黄膜举起形成受精膜。

2.3 极体的释放与雌、雄原核的结合

行体外受精的软体动物，精子入卵的时机有两种情形，一种是胚泡存在，初级卵母细

胞处于第 1 次成熟分裂之前；另一种是胚泡消失，初级卵母细胞处于第 1 次成熟分裂中期(楼允东等，1981)。而鲍属于后者，即精子入卵之后，卵子开始两次成熟分裂。第 1 次成熟分裂染色体数目减半，其结果是从动物极释放出第 1 极体。电镜下可观察到极体离开卵质时，微丝被牵伸为纺锤形(图版Ⅱ:7a)，极体一侧与卵母细胞一侧的胞质中都可见到呈绒线状环绕的髓样体(myelin-like bodies)，这些髓样体(图版Ⅱ:7b)可能是溶酶体吞噬了一部分损耗的胞器形成的。

随着受精卵的发育，不久卵子又释放出第 2 极体(图版Ⅱ:8)，从而完成减数分裂，并形成具有单倍染色体的雌原核 (female pronucleus)。此时可见第 1 极体内的核膜清晰，核内的染色质呈局部密集状，胞质中有数个线粒体(图版Ⅱ:8)。动物卵子减数分裂过程中，有的第 1 极体可以再分裂 1 次，有的第 1 极体不再分裂。本文观察到鲍的第 1 极体又分裂产生两个退化的细胞(图版Ⅱ:9)。

极体释放后，在卵子放出极体的动物极附近的卵质中，可见许多线粒体和小囊泡等，而卵黄颗粒明显减少(图版Ⅱ:7a)，这说明在减数分裂过程中消耗掉了许多卵黄物质。

在卵子释放极体的同时，进入卵内的精子形成了雄原核(male pronucleus)。进一步，雄原核(图版Ⅱ:10)由皮层向雌原核移动，雌原核也向雄原核移动，最终，雌、雄原核融合形成合子核，完成了整个受精过程。

综上所述，皱纹盘鲍的受精过程与海胆等海洋无脊椎动物的受精过程(Endo，1961；Lopo 等，1980，1981)大致相同，即经历了精子顶体反应、卵子皮层反应、两性原核的融合等阶段。所不同的是，海胆在精子入卵时，卵母细胞已经完成了成熟分裂；而鲍是在精子入卵之后，才开始减数分裂，并相继释放出第 1、第 2 极体。

2.4　多精入卵现象

一般体外受精的软体动物是单精入卵，单精受精。本研究还观察到在鲍受精卵的卵周隙中，有数个精子尾部的横切(图版Ⅱ:11)，在几微米短的距离内，这些精子尾部的横切不可能是同一个精子由于尾部弯曲而造成的赝象，因此是多精入卵。

在一些软体动物中有多精入卵的现象，但仅有一个精子形成雄原核，并最终与雌原核结合，因此卵子仍可正常发育(Raven，1966)。其他的多余的精子在卵内被逐渐吸收崩解，但吸收时间因种类不同而异，或在减数分裂期间，或迟至第 1 次卵裂时才被吸收（楼允东等，1981)。本文见到鲍释放出第 1、第 2 极体之后，仍有穿过卵黄膜而未穿入质膜的精子头部，尚未完全被吸收(图版Ⅱ:12)。Jaffe(1976)认为，海胆阻滞多精入卵的机制有两个方面：1) 精卵接触的最初数秒钟内卵的质膜电位的改变，导致迅速但不完全的阻滞；2) 皮层反应形成受精膜，完全阻滞了后期多精入卵。这与本研究观察到的鲍的多精入卵现象联系起来分析，可以认为，鲍受精时卵质膜电位的变化，迅速阻滞了“早期”穿过卵黄膜的多余精子穿入质膜，皮层反应使“后期”到达卵黄膜的多余精子失去了入卵的可能性，尽管这种“早期”、“后期”的差异可能只有数秒钟。关于鲍受精时卵的质膜电位的变化尚待研究。

致谢　青岛海洋大学副教授包振民博士曾对本研究提出宝贵建议，谨致谢意。

图 版 说 明

图版 I (Plate I)

1a 鲍精子头部纵切 (vertical section of the sperm head of abalone) ×20400

1b 鲍精子尾部鞭毛横切 (cross section of the sperm tail of abalone) ×51000

2 精子进入卵的胶膜、顶体向前突出 (sperm entering the jelly coat of egg, acrosome protruding forward) ×8500

3 精子接近卵黄膜、顶体明显伸长 (sperm near the vitelline membrane, acrosome elongating) ×5100

4 顶体突起的顶端接触卵黄膜 (vertex of the acrosome process contacted the vitelline membrane) ×8000

5 穿过卵黄膜的精子(头部横切) (sperm penetrated through the vitelline membrane) ×20400

6 微绒毛基部的微吞饮泡破裂(箭头处)、内含物逸出到卵周隙中(the arrowhead indicates rupture of the microphage in the microvilli, substance lost to the perivitelline space) ×25500

图版 II (Plate II)

7a. 受精卵放出第1极体；卵质中的卵黄颗粒明显减少 (fertilized egg releasing first polar body, the yolk granules reduced in the egg plasm) ×3250

7b 7a方框部分的放大、示髓样体 (enlargement of Figure 7a, showing the myelin-like bodies) ×19500

8 受精卵又放出第2极体、箭头处示第1极体内的核膜(fertilized egg released second polar body, arrowhead shows the nucleus membrane in the first polar body) ×5100

9. 第1极体又分裂产生两个退化的细胞 (the first polar body dividing into two degenerate cells) ×8500

10 位于卵皮层中的雄原核 (the male pronucleus be situated in the cortex of egg) ×26000

11 卵周隙中有3个精子的尾部、示多精入卵 (three the sperm tails in the perivitelline space, showing polyspermy) ×18000

12. 卵周隙中未完全崩解的精子头部(non-completely collapse head of the sperm in the perivitelline space) ×8500

AC：顶体帽(acrosome cap)	AF：顶体下窝(acrosome fossa)	SN：精子核(sperm nucleus)
PM：质膜(plasma membrane)	VM：卵黄膜(vitelline membrane)	JC：胶膜(jelly coat)
AE：顶体(acrosome)	M：线粒体(mitochondria)	AP：顶体突起(acrosome process)
SP：精子(spermatozoa)	MV：微绒毛(microvilli)	ME：微吞饮泡(microphage)
PVS：卵周隙(perivitelline space)	FM：受精膜(fertilization membrane)	MP：雄原核(male pronucleus)
1PB：第1极体(first polar body)	2PB：第2极体(second polar body)	ML：髓样体(myelin-like bodies)
CH：染色质(chromatin)		

参 考 文 献

丁汉波、余允樑、黄浙、1987 发育生物学 北京：高等教育出版社 66—149

于豪建、1984. 动物的发育 北京：人民教育出版社. 51—86

王如才、王克行、1980 贝类养殖学. 北京：农业出版社 352—363

王瑞霞、张毓人、傅仑生等、1982 鲂鱼受精早期精子入卵的扫描电子显微镜观察. 水产学报、6(4)：313—320.

王瑞霞、张毓人、傅仑生等、1984 家养鱼类受精生物学的研究 II 几种淡水鱼类成熟卵球的精孔器与精子入卵通路的光镜与扫描电镜观察 水生生物学报、8(2)：171—182

许 雁、熊全沫、1988 中华鲟授精过程扫描电镜观察. 动物学报、34(4)：325—328

陈 木、卢豪魁、陈世杰等、1977 皱纹盘鲍人工育苗的初步研究. 动物学报、23(1)：35—46

聂宗庆、1989. 鲍的养殖与增殖 北京：农业出版社 66—157

堵南山、赖 伟、安 婴等、1992. 中华绒螯蟹受精的细胞学研究. 中国科学(B辑)、3：260—265

黄永松、1990. 尼罗罗非鱼成熟卵结构及精子入卵早期的电镜研究. 动物学报、36(3)：227—230.

楼允东、郑德崇、1981 组织胚胎学、北京：农业出版社 212—271

猪野峻、1952 邦产アワビ属の増殖に关える生物学的研究 东海水研研究报告、(5)：1—102.

Brummett A R、Dumont J N、1979 Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*. *J Exp Zool* **210**：417—434.

Endo Y、1961 Changes in the cortical layer of sea urchin eggs at fertilization as studied with the electron microscope 1. Clypeaster Japonicus *Ex Cell Res*，**25**：383—397

Iwamatsu T、Ohta T、1981 Scanning electron microscopic observation on sperms penetration in teleostean fish

J Exp Zool, **215**: 261-277

Jaffe L A. 1976 Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated *Nature* (London), **261**: 68-71.

Lewis C A Talbot C F, Vacquier V D, 1982 A protein from abalone sperm dissolves the egg vitelline layer by a nonenzymatic mechanism. *Develop Biol.*, **92**: 227-239.

Lopo A C, Vacquier V D 1980 Antibody to a surface glycoprotein inhibits the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm *Dev Biol*, **79**: 325-333

Lopo A C, Vacquier V D, 1981 Gamete interaction in the sea urchin A model for understanding the molecular details of animal fertilization. In: Mastroianni L Jr, J D Biggers eds Fertilization and early development. New York: Plenum 199-232

Raven C P, 1966 Morphogenesis the analysis of molluscan development Oxford: Pergamon.

OBSERVATION ON THE PRECESS OF FERTILIZATION OF *Haliotis discus hannai* WITH TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE

Sun Zhenxing　Wang Rucai　Jiang Ming　Liu Xiaoyun

(Ocean University of Qingdao　266003)

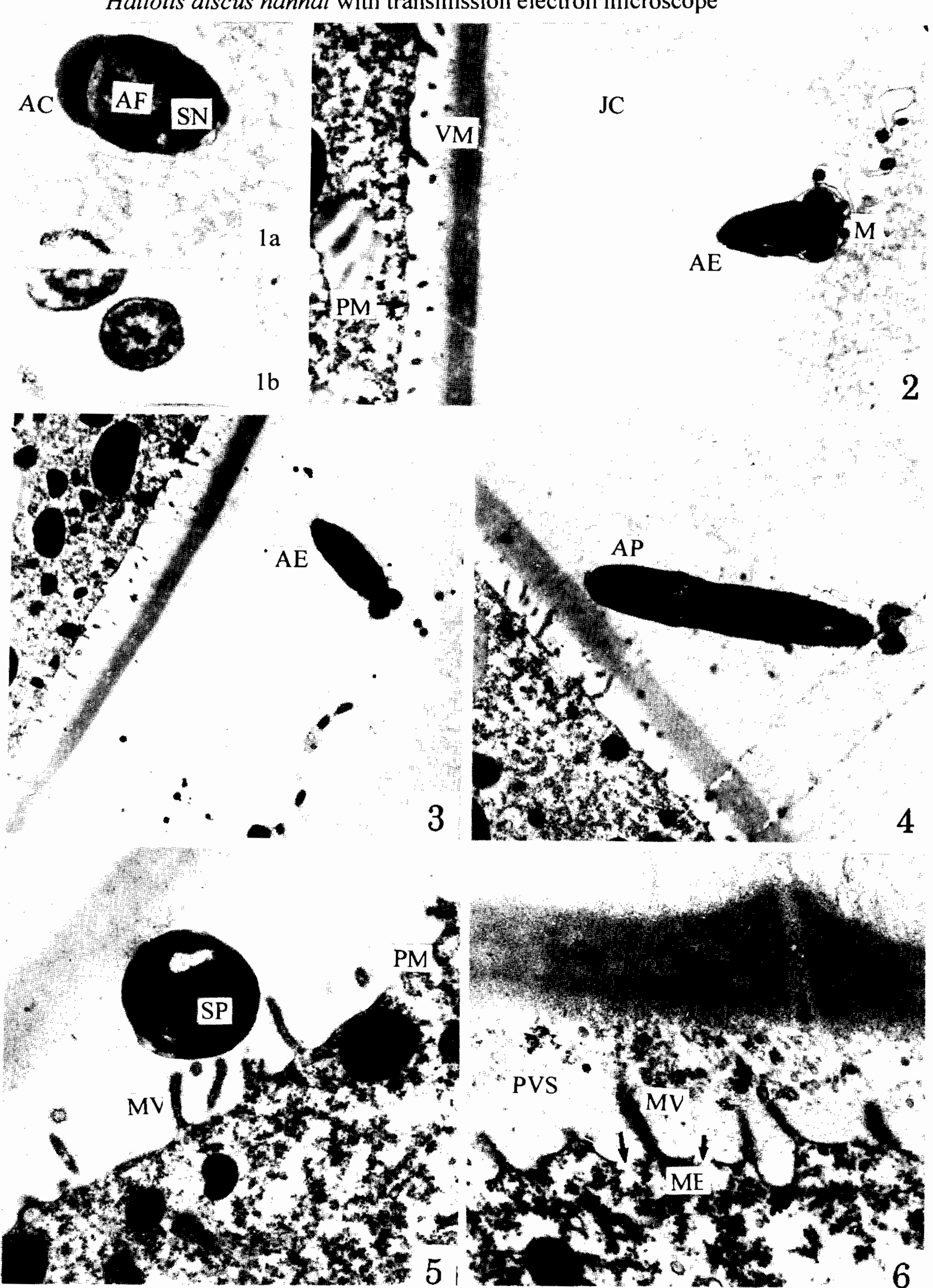
Xie Jialin

(Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao　266071)

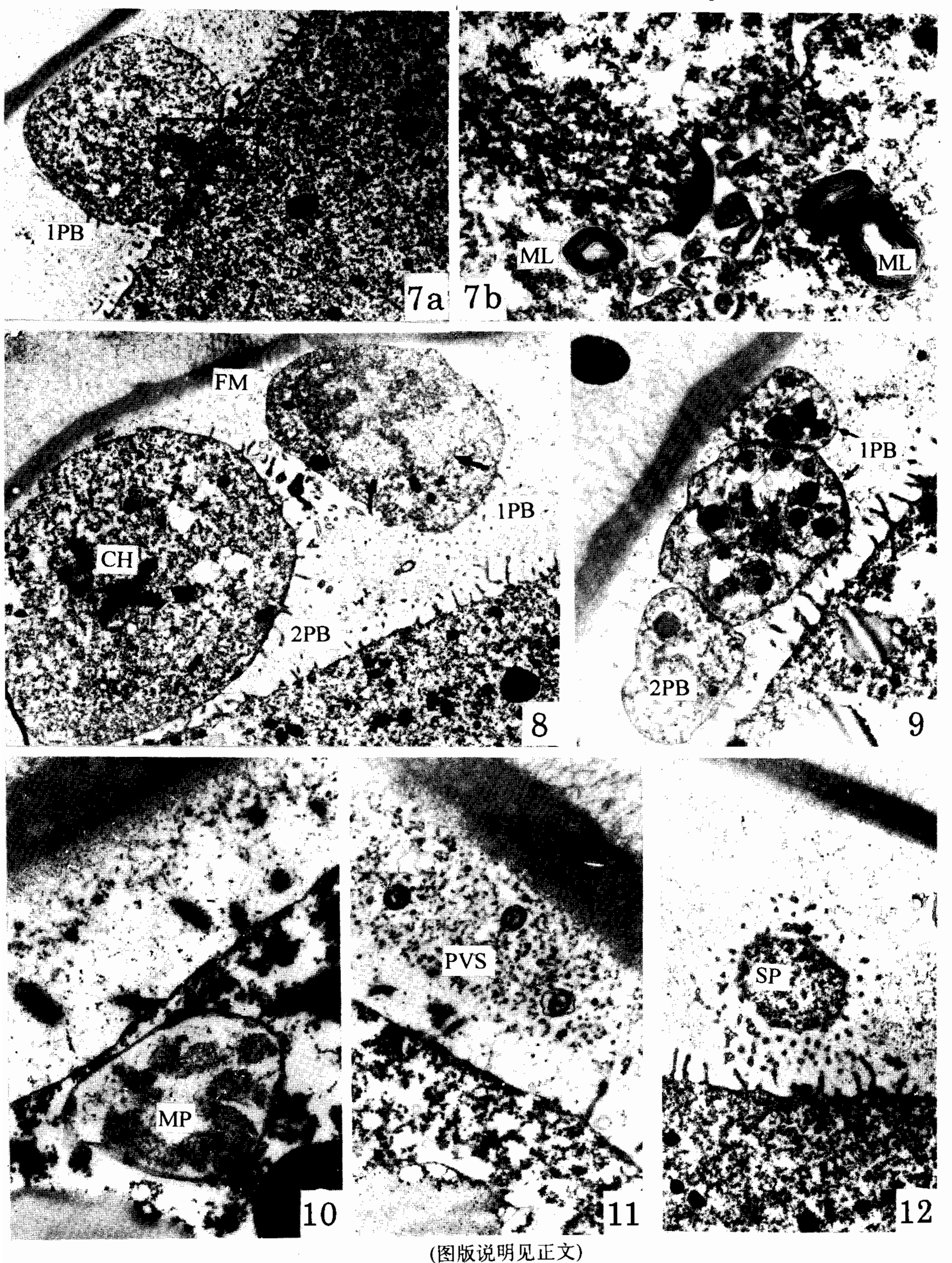
Abstract

This thesis studied the process of fertilization of the abalone (*Haliotis discus hannai*) with transmission electron microscope (TEM). The jelly coat of abalone egg activated spermatozoa and induced acrosome reaction. The vitelline membrane promoted the acrosome reaction reach the climax. After the sperm entered the egg, the egg cortical reaction took place and the fertilization membrane was formed. Afterwards, the egg's meiosis began. Besides, we found polyspermy of the abalone.

Key words　*Haliotis discus hannai*, Fertilization, Acrosome reaction, TEM



(图版说明见正文)



(图版说明见正文)